

Deteksi *white spot syndrome virus (WSSV)* dengan metode *single step polymerase chain reaction (PCR)*





© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar Isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1. Ruang lingkup	1
2. Istilah dan definisi	1
3. Prinsip umum	2
4. Peralatan.....	2
5. Bahan	2
6. Prosedur	3
7. Pengamatan hasil dan dokumentasi.....	5
8. Intepretasi hasil	5
9.Jaminan mutu	6
Bibliografi	10
Lampiran A (informatif) Contoh pembuatan larutan.....	7
Lampiran B (informatif) Ekstraksi.....	9

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang deteksi *white spot syndrome virus* (WSSV) dengan metode *single step polymerase chain reaction* (PCR).

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis (PT) 65-07 Perikanan Budidaya dan dibahas dalam rapat konsensus pada tanggal 23 - 25 Juni 2014 di Bogor yang dihadiri oleh anggota panitia teknis, unsur pemerintah, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya dengan memperhatikan:

1. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
2. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. KEP. 26/MEN/2013 tentang penetapan jenis – jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK), Golongan, Media Pembawa, dan sebarannya.

Standar ini telah dilakukan jajak pendapat pada tanggal 30 Agustus 2014 sampai dengan 29 Oktober 2014 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi *white spot syndrome virus* (WSSV) dengan metode *single step polymerase chain reaction* (PCR)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *white spot syndrome virus* (WSSV) dengan menggunakan metode *single step polymerase chain reaction* (PCR).

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan :

2.1

alikuot

pembagian menjadi beberapa ukuran yang lebih kecil agar memudahkan pemakaian dan mencegah dari kemungkinan kontaminasi

2.2

amplifikasi

proses penggandaan asam deoksiribonukleat (DNA) secara *in vitro* menggunakan enzim polimerase

2.3

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

2.4

denaturasi

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

2.5

ekstensi

proses sintesis DNA baru yang komplemen terhadap DNA target dengan bantuan enzim DNA polimerase

2.6

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan berat molekul dalam medan listrik

2.7

koktail

larutan yang berisi berbagai komponen untuk proses amplifikasi

2.8

pelet

endapan yang terbentuk hasil sentrifugasi

2.9

primer

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.10

supernatan

cairan hasil sentrifugasi

2.11

template

DNA hasil ekstraksi yang digunakan sebagai cetakan untuk proses amplifikasi

3 Prinsip umum

Mengisolasi DNA dari organ/jaringan target yang diduga terinfeksi *white spot syndrome virus*, dilanjutkan dengan amplifikasi secara *single step* menggunakan mesin *thermal cyclor*.

4 Peralatan

- a) mesin PCR (*thermal cyclor*);
- b) alat pengukur konsentrasi asam nukleat berbasis UV spektrofotometri;
- c) alat elektroforesis gel agarose;
- d) alat dokumentasi;
- e) *hot plate*;
- f) *laminar flow cabinet* ;
- g) *mini mixer* ;
- h) mikropipet;
- i) peralatan bedah;
- j) peralatan gelas (labu ukur, botol kaca dan *beaker glass*);
- k) sentrifus minimal 12 000 x g (12 000 rpm);
- l) timbangan analitik;
- m) transiluminator UV.

5 Bahan

- a) akuades steril;
- b) alkohol 70%;
- c) agarose;
- d) asam asetat (CH_3COOH);
- e) bufer *tris acetate* EDTA (TAE) atau TBE;
- f) etanol p.a;
- g) isopropanol (2-propanol);
- h) kit ekstraksi DNA komersial dengan metode *spin colum*;
- i) mikrotip berbagai ukuran 10 μl – 1 000 μl ;
- j) masker;
- k) *marker* DNA (100 bp DNA *ladder*);
- l) *nuclease free water*;
- m) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- n) pewarna DNA (10 mg/ml);
- o) proteinase K;
- p) reagensia PCR;
- q) sarung tangan (*powder-free*);
- r) 1 set primer spesifik (Nunan dan Lightner, 2011) :
 - Primer *forward* : 146F2 : 5'GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A 3'
 - Primer *reverse* : 146R2: 5'TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T 3'
- s) tabung mikro ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2 ml;

- t) *tris base*.

6 Prosedur

6.1 Persiapan contoh uji

- a. Telur, larva dan pascalarva
ambil contoh uji dari seluruh tubuh udang.
- b. Juvenil sampai dewasa
Contoh dapat diambil dari bagian kaki renang (pleopod) hemolimp, otot, insang, baik segar maupun beku ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) atau yang sudah diawetkan dalam larutan etanol minimal 75%.

6.2 Ekstraksi DNA menggunakan *spin column*¹

- a) sebelum proses dimulai, panaskan *elution buffer* pada $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- b) masukkan contoh uji udang dengan berat 25 mg - 50 mg ke dalam 1,5 ml tabung mikro.
- c) tambahkan 200 μl *tissue lysis buffer* dan 40 μl Proteinase K dan homogenkan.
- d) inkubasikan selama 1 jam pada $55\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- e) tambahkan 200 μl *binding buffer* dan homogenkan.
- f) inkubasikan 10 menit pada $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- g) tambahkan 100 μl isopropanol dan homogenkan.
- h) buang bagian contoh uji yang tidak terlarut dengan mikropipet.
- i) pasangkan "*high filter tube*" dengan "*collection tube*".
- j) pipet seluruh cairan contoh uji dan masukkan ke bagian atas kombinasi *tube* tersebut.
- k) sentrifugasi selama 1 menit pada $8\,000 \times g$.
- l) pisahkan "*filter tube*" dari "*collection tube*" dan buang larutan hasil sentrifugasi.
- m) pasangkan kembali "*filter tube*" dengan "*collection tube*" yang baru.
- n) tambahkan 500 μl *inhibitor removal buffer* ke dalam bagian atas "*filter tube*".
- o) sentrifugasi selama 1 menit pada $8\,000 \times g$.
- p) pisahkan "*filter tube*" dari "*collection tube*" dan buang larutan hasil sentrifugasi.
- q) pasangkan kembali "*filter tube*" dengan "*collection tube*" yang baru.
- r) tambahkan 500 μl *wash buffer* ke dalam bagian atas "*filter tube*".
- s) sentrifugasi selama 1 menit pada $8\,000 \times g$ dan buang larutan hasil sentrifugasi.
- t) pasangkan kembali "*filter tube*" dengan "*collection tube*".
- u) sentrifugasi kembali selama 10 detik pada kecepatan maksimal.
- v) buang "*collection tube*".
- w) pasangkan "*filter tube*" dengan 1,5 ml tabung mikrosentrifus steril (*nuclease free*).
- x) tambahkan 200 μl *elution buffer* yang telah dipanaskan ke dalam bagian atas "*filter tube*".
- y) sentrifugasi selama 1 menit pada $8\,000 \times g$.
- z) gunakan larutan DNA secara langsung untuk PCR maupun simpan pada $2\text{ }^{\circ}\text{C} - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ atau $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai dengan $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk analisa lebih lanjut.

6.3 Reaksi PCR dan amplifikasi PCR

¹ prosedur ekstraksi DNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan kompatibel dengan bahan amplifikasi yang sudah divalidasi

- a) setiap analisa WSSV dengan PCR harus ada kontrol WSSV positif dan kontrol negatif atau *non template control*.
- b) siapkan reaksi PCR dengan memilih salah satu komposisi pada Tabel 1, Tabel 2 atau Tabel 3:

Tabel 1 Komposisi bahan koktail PCR dengan *PCR beads*

Komposisi	Volume (µl)	Konsentrasi akhir
Akuades steril	22	-
146F2 (10 µM)	0,5	0,2 µM
Primer 146R2 (10 µM)	0,5	0,2 µM
Template	2	0,8 ng -8 ng
Total	25	-
CATATAN Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi		

Tabel 2 Komposisi bahan koktail PCR

Komposisi	Volume (µl)	Konsentrasi akhir
akuabides	14,875	-
5 x PCR buffer	5,0	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5 mM
dNTPmix (10 mM)	0,5	200 µM
primer 146 F2 (10 µM)	0,5	0,2 µM 0,2 µM
primer 146 R2 (10 µM)	0,5	0,025 U
Taq DNA polymerase (5 U/ µl)	0,125	0,8 ng -8 ng
DNA template	2,000	
Total	25	-
CATATAN Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi		

Tabel 3 Komposisi bahan koktail PCR dengan *mastermix* komersial

Komposisi	Volume (µl)	Konsentrasi akhir
akuabides	9,5	-
2 x <i>mastermix</i>	12,5	1x
primer 146 F2 (10 µM)	0,5	0,2 µM
primer 146 R2 (10 µM)	0,5	0,2 µM 0,8 ng -8 ng
DNA template	2	-
Total	25	
CATATAN Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi		

- c) setelah semua bahan dicampur kecuali *template*, bagikan ke dalam tabung mikro 0,2 ml dengan volume masing-masing 23 µl.
- d) tambahkan *template* atau contoh uji DNA, termasuk kontrol positif dan kontrol negatif (ddH₂O), pada masing-masing tabung mikro sebanyak 2 µl.
- e) atur profil amplifikasi seperti Tabel 4.

Tabel 4 Profil amplifikasi

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Denaturasi awal	94	3 menit	-
Denaturasi	94	20 detik	40
Annealing	62	20 detik	
Ekstensi	72	30 detik	
Ekstensi akhir	72	3 menit	-
<i>Hold</i>	4	sampai proses berikutnya	-
CATATAN Komposisi reaksi dan prosedur amplifikasi PCR disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan			

- f) homogenkan dan masukkan tabung mikro ke dalam mesin PCR (*thermocycler*).
- g) setelah proses berakhir, matikan *thermocycler* dan keluarkan tabung mikro.
- h) produk PCR siap dijalankan di elektroforesis.

6.4 Elektroforesis

6.4.1 Persiapan

Contoh pembuatan bufer elektroforesis dan gel dapat dilihat pada Lampiran A.

6.4.2 Prosedur

- a) letakkan 1,5% gel agarose ke elektroforesis *chamber*.
- b) tambahkan larutan TBE 0,5 x ke dalam elektroforesis *chamber* hingga gel agarose terendam.
- c) siapkan 2 µl *loading buffer* di atas parafilm sesuai jumlah contoh dan 1 marker.
- d) ambil contoh uji hasil PCR sebanyak 10 µl dan campur dengan *loading buffer*.
- e) masukkan ke dalam sumuran dengan menggunakan mikropipet disertakan juga *marker* DNA sebanyak 2 µl.
- f) masukkan contoh uji ke masing-masing sumuran kemudian pasang tutup elektroforesis *chamber* dan alirkan arus listrik dengan voltase 100 V -150 V.
- g) hentikan elektroforesis setelah pewarna biru-bromofenol mencapai 2/3 bagian panjang gel agarose.

7 Pengamatan hasil dan dokumentasi

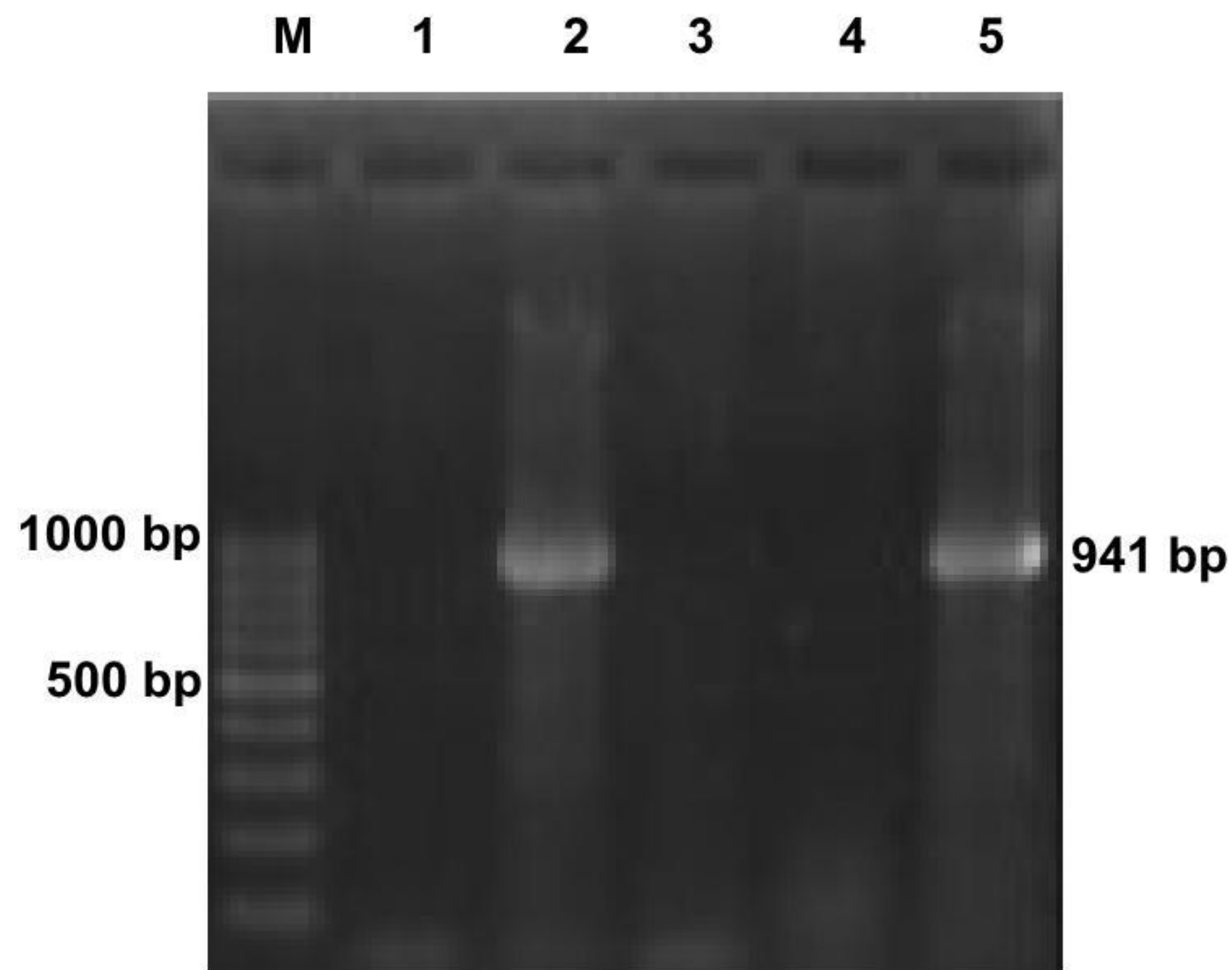
- a) setelah selesai proses elektroforesis, gel diangkat dari *chamber*.
- b) rendam gel dalam larutan zat pewarna DNA 0,05% selama 10 menit. Gunakan sarung tangan.
- c) rendam gel dengan akuades/ air mengalir selama 10 menit.
- d) amati dengan transiluminator UV dan dokumentasikan.

8 Intepretasi hasil

Berdasarkan pola pita pada gel agarose setelah proses elektroforesis terhadap produk PCR menggunakan pasangan primer 146 F2 dan 146 R2 yang diamati dengan transiluminator UV, maka:

- kontrol negatif (blangko/akuabides): tidak terlihat adanya pita berukuran 941 bp;
- kontrol DNA negatif (DNA selain WSSV): tidak terlihat adanya pita berukuran 941 bp;

- kontrol positif : terlihat adanya pita berukuran 941 bp;
- contoh uji negatif WSSV: tidak terlihat adanya pita berukuran 941 bp;
- contoh uji positif WSSV: terlihat adanya pita berukuran 941 bp.



Keterangan :

- M : Marker (100 bp DNA Ladder)
 1 : Kontrol negatif WSSV
 2 : Kontrol positif WSSV (941 bp)
 3 : Contoh uji negatif WSSV
 4: Contoh uji negatif WSSV
 5 : Contoh uji positif WSSV (941 bp)



Gambar 1 - Hasil elektroforesis contoh uji yang telah diamplifikasi

9 Jaminan mutu

- hasil ekstraksi DNA mempunyai rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,8 – 2,0.
- proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif dan 2 kontrol negatif menunjukkan hasil yang konsisten.

Lampiran A
(informatif)
Contoh pembuatan larutan

B.1 Pembuatan larutan TAE 20 x

- a) larutan 1 : timbang 15,77 gr EDTA 3 Na tambahkan ke 100 ml akuades steril.
- b) larutan 2 : timbang 96,8 g tris dan 28 g asam asetat (\pm 30 ml) tambahkan ke 900 ml akuades steril.
- c) campurkan kedua larutan dan setarakan pada pH 8.
- d) buat larutan TAE 1 x (siap pakai), larutkan 1 bagian larutan stok dengan 19 bagian akuades steril. Untuk membuat larutan 1 liter TAE 1 x adalah : ambil 50 ml larutan 20 x TAE kemudian diencerkan dalam 950 ml akuades steril).

B.2 Bufer TBE 5 x dan TBE 0,5 x

Cara membuat TBE 5 x:

- a) masukkan 800 ml akuades ke dalam *beaker glass* berkapasitas 1 l.
- b) masukkan 54 g *Tris base* dan 27,5 g asam borat ke dalam *beaker glass* yang telah berisi akuades dan aduk dengan *magnetic stirrer* sampai terlarut.
- c) tambahkan 20 ml 0,5 M EDTA, homogenkan.
- d) tambahkan akuades sampai 1 l.
- e) alikuot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

Cara membuat TBE 0,5 x:

campurkan 1 bagian TBE 5x dengan 9 bagian akuades

B.3 Pembuatan pewarna DNA (10 mg/ml)

- a) tambahkan 1 g pewarna DNA ke dalam 100 ml akuades.
- b) aduk dengan *magnetic stirrer* beberapa jam sampai pewarna DNA terlarut.
- c) bungkus tabung dengan aluminium foil atau pindahkan ke dalam botol gelap dan simpan pada suhu kamar.
- d) untuk membuat larutan pewarnaan (siap pakai), ambil 10 μ l 1% pewarna DNA kemudian diencerkan ke dalam 100 ml akuades, campurkan, larutan siap digunakan.

B.4 Pembuatan gel agarose 1,5%

- a) timbang 1,5 g bubuk agarose dan masukkan dalam erlenmeyer ukuran 250 ml. Larutkan dengan 100 ml bufer TAE 1 x lalu panaskan di atas *hot plate* sampai mendidih atau larutan menjadi bening.
- b) angkat dari *hot plate* lalu dinginkan dalam temperatur ruang sampai mencapai 50 °C.
- c) setelah itu cetak agarose di atas cetakan gel yang sudah dipasang sisir (*comb*) selama 20 menit – 60 menit.
- d) gel siap digunakan.

A.4 Pembuatan alkohol 70 %

Ambil 70 ml alkohol 96% kemudian ditambahkan akuades sampai dengan volume 96 ml (26 ml akuades).



Lampiran B (informatif) Ekstraksi

B.1 Ekstraksi DNA menggunakan *lysis buffer*

- masukkan pleopod, periopod atau insang sebanyak 2 buah (20 mg) atau sebanyak 25 ekor - 50 ekor (*post larva* < PL 12) ke dalam tabung mikro ukuran 1,5 ml.
- tambahkan 500 μ l *lysis buffer* ke dalam tabung mikro kemudian hancurkan hingga homogen.
- inkubasikan dalam 95 °C selama 10 menit.
- sentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm (4800 x g dengan r = 3 cm) selama 10 menit.
- pindahkan supernatan sebanyak 200 μ l ke dalam tabung mikro baru ukuran 1,5 ml dan tambahkan 400 μ l alkohol 95%.
- homogenkan, kemudian sentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm (4800 x g dengan r = 3 cm) selama 5 menit.
- uang alkohol, lalu keringkan pelet.
- larutkan pelet dengan DEPC ddH₂O atau bufer TE.
- DNA siap digunakan kalau tidak langsung digunakan harus disimpan pada -20 °C.



Bibliografi

Nunan, L.M. and D.V. Lightner, 2011. Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus. Journal of Virological Methods 171 : 318 - 321

